

DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRFÍA DE GASES PARA LA DIFERENCIACIÓN DE NUECES (*JUGLANS REGIA*) SEGÚN SU ORIGEN

Máster Interuniversitario en Agroalimentación,
Perfil investigador

Especialidad: Producción Agroalimentaria



Tutoras:

Dolores Bellido Milla

Estrella Espada Bellido

Pablo Fuentes Soriano



Determinación de ácidos grasos por cromatografía de gases para la diferenciación de nueces (*Juglans Regia*) según su origen

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Pablo Fuentes Soriano

Máster interuniversitario en agroalimentación

2018-2019

MEMORIA PRESENTADA POR
PABLO FUENTES SORIANO
PARA OPTAR AL MÁSTER INTERUNIVERSITARIO EN
AGROALIMENTACIÓN

Fdo: Pablo Fuentes Soriano

A handwritten signature in purple ink, consisting of stylized, overlapping loops and strokes, positioned below the printed name.

Dra. Dña. Dolores Bellido Milla y Dra. Dña. Estrella Espada Bellido, Profesoras del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz

HACEN CONSTAR:

Que el presente trabajo de investigación titulado: **“Determinación de ácidos grasos por cromatografía de gases para la diferenciación de nueces (*Juglans Regia*) según su origen”** ha sido realizado, bajo su tutorización, por D. Pablo Fuentes Soriano para optar al Máster Interuniversitario en Agroalimentación por la Universidad de Cádiz.

Y para que conste, expiden y firman la presente certificación

En Puerto Real, a 4 de diciembre de 2019



Fdo.: Dra. Dña. Dolores Bellido Milla



Fdo.: Dra. Dña. Estrella Espada Bellido

AGRADECIMIENTOS

Este Trabajo Fin de Máster ha sido posible gracias al apoyo y ayuda de muchas personas. Llegar hasta aquí no ha sido fácil y todo lo que he logrado en esta investigación y en la universidad en general no son méritos solo míos si no de todas las personas que me han acompañado y animado a dar siempre lo mejor.

En primer lugar, quiero agradecerles a mis tutoras Dolores Bellido Milla y Estrella Espada Bellido por su increíble ayuda y dedicación con este proyecto. A pesar de no considerarme muy optimista a lo largo de la realización del trabajo siempre han sabido sacar la parte positiva de cada resultado, aunque no la hubiese, para animarme a continuar investigando y dejar que creciera mi curiosidad. De entre todas las asignaturas del Grado y el Máster, en las investigaciones que he realizado con ellas ha sido donde más he aprendido. Gracias por darme la oportunidad de haber trabajado en equipo con vosotras. Agradezco también la ayuda de María Purificación Hernández Artiga, que siempre nos ha aconsejado y nos ha dado ideas increíblemente interesantes sin las que este trabajo no hubiera sido lo que es.

Por otra parte, quiero agradecer a Ceferino Carrera Fernández por su colaboración en este trabajo. Siempre se ha detenido por el departamento o por los pasillos de la facultad para preguntarme por los resultados y me ayudaba con cualquier duda o problema me ayudaba sin decírselo dos veces.

A mis compañeros del departamento Juanjo, David, Lorena y Pablo que además de hacer que se me pasaran las horas más rápidas en el laboratorio, me echaban una mano con lo que necesitase. A Edurne, María Jesús y Pepa, técnicos del departamento de Química Analítica y que siempre me han solucionado todos los inconvenientes que iban apareciendo. A mi compañera de facultad Marta que ha estado atenta a mí desde el Grado y se ha asegurado de que no tirara la toalla. A Ana, María José y Mercedes por animarme siempre y aconsejarme.

A mis amigos Gino, Luiti, Iovi, Jose, Álvaro, Rubén y Juanjo por hacer que fuera de la facultad desconectase y me riese siempre. A mis compañeros del máster por hacer que un año que no parecía motivador se convirtiese en uno de los mejores en la universidad.

A Irene por tener fe en que siempre iba a obtener resultados y aunque no fuera así estaba dispuesta a ayudarme en lo que fuese necesario. Muchas gracias por confiar siempre en mí.

A mis hermanos y mis padres, porque siempre confían en mí aunque ni yo lo mismo lo haga y desde que tengo recuerdo siempre han esperado grandes cosas de mí, por lo que espero cumplir sus expectativas.

“Cualquier enfermedad que pueda curarse con la dieta no debe ser tratada de ningún otro modo”

Maimónides Filósofo Siglo XII

1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1. Ácidos grasos presentes en las nueces	4
3.1.1. Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga	4
3.1.2. Ácidos grasos monoinsaturados de cadena larga.....	7
3.1.3. Ácidos grasos saturados de cadena larga	7
3.2. Extracción de los ácidos grasos presentes en las muestras de nueces	8
3.3. Determinación de ácidos grasos mediante cromatografía de gases con ionización de llama (FID)	10
3.4. Antecedentes bibliográficos.....	11
4. MATERIALES Y MÉTODOS	13
4.1. Reactivos	13
4.2. Instrumentación	13
4.3. Toma de muestra.....	14
4.4. Extracción de los ácidos grasos presentes en la nuez	14
4.4.1. Extracción mediante sistema soxhlet	14
4.4.2. Extracción mediante sistema de ultrasonidos	15
4.5. Derivatización de las muestras. Metilación de los ácidos grasos presentes en el aceite de nuez	16
4.6. Determinación de ácidos grasos metilados por cromatografía de gases	16
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
5.1. Extracción del aceite de las muestras de nueces	16
5.2. Determinación de ácidos grasos mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID)	18
5.3. Análisis de las muestras de nueces	22
5.4. Estudio descriptivo	23
5.5. Análisis de correlación y Análisis de la varianza (ANOVA).....	27
6. CONCLUSIÓN.....	31
7. PLAN DE DIFUSIÓN	32
8. BIBLIOGRAFÍA	33



1. RESUMEN

Los ácidos grasos son esenciales debido a sus importantes funciones en el organismo y pueden ser incorporados en la dieta a través de alimentos de origen animal y vegetal. Las nueces destacan por su alto contenido en ácidos grasos, siendo los principales los ácidos grasos poliinsaturados el linoleico ($\omega 6$) y el α -linolénico ($\omega 3$) recomendables para personas con problemas cardiovasculares.

En este trabajo se ha llevado a cabo un muestreo de 12 variedades de nueces (*Juglans Regia*) de diferentes cultivos y con distinto origen geográfico que se encuentran al alcance del consumidor y, además, 1 muestra de aceite de nueces y 1 muestra de almendra. Para el análisis de estas muestras se ha adaptado un procedimiento de extracción descrito en la bibliografía para nueces de macadamia para la extracción de ácidos grasos en nueces *Juglans Regia*. Se determinaron los ácidos grasos por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) previa formación de los ésteres metílicos correspondientes mediante una reacción en medio básico.

Por último, con los resultados de los análisis se llevó a cabo un estudio descriptivo haciendo uso de los diagramas de estrellas y rayos. Esta representación multivariante permite visualizar el conjunto de los resultados y además caracterizar y comparar las diferentes muestras en función de la forma de la estrella. También se llevó a cabo un estudio de correlación entre el porcentaje de los distintos ácidos grasos. Los resultados indicaron que existía correlación positiva entre los ácidos linoleico ($\omega 6$) y linolénico ($\omega 3$) y una correlación negativa entre el ácido linoleico ($\omega 6$) y el oleico ($\omega 9$). Finalmente se aplicó el análisis de la varianza y se determinaron diferencias significativas para el porcentaje de ácidos grasos entre muestras de nueces de diferente origen geográfico. Como se esperaba, se obtuvieron altos contenido en ácidos grasos poliinsaturados en comparación con otros frutos secos.



2. SUMMARY

Fatty acids are essential because of their important functions in the human organism and can be incorporated into the diet through animal and plant foods. Walnuts are known for their high content in fatty acids, the main polyunsaturated fatty acids linoleic ($\omega 6$) and α -linolenic ($\omega 3$), are recommended for persons with cardiovascular problems.

In this work a sampling of 12 walnuts (*Juglans Regia*) from different crops and geographical origin available to the consumer has been carried out and besides, one walnut oil and one almond. For the analysis of these samples, an extraction procedure described in the bibliography for macadamia nuts has been adapted for the extraction of fatty acids in walnuts. The fatty acids were determined by gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID) after formation of the corresponding methyl esters by means of a reaction in a basic medium.

A descriptive study using star and ray diagrams was carried out with the results of the analyses. This multivariate representation makes possible the visualization of the results as a whole and to characterize and compare the different samples according to the shape of the star. A correlation study between the percentages of different fatty acids was also carried out. The results indicated that there was a positive correlation between linoleic acid ($\omega 6$) and α -linolenic acid ($\omega 3$) and a negative correlation between linoleic acid ($\omega 6$) and oleic acid ($\omega 9$). Finally, analysis of variance was applied and significant differences were found for the percentage of fatty acids between walnut samples of different geographical origin. As expected, high content of polyunsaturated fatty acids was obtained in comparison with other nuts.



3. INTRODUCCIÓN

El cambio en los hábitos alimentarios hacia una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados conlleva una mejora importante de la salud. Esto es debido a que estos ácidos grasos constituyen los componentes estructurales y funcionales de las membranas de las células y son el sustrato necesario para la síntesis de mediadores como las prostaglandinas en numerosos procesos fisiológicos, especialmente para el correcto funcionamiento del sistema nervioso central y del sistema cardiovascular. La forma óptima de aportar ácidos grasos poliinsaturados es a través de una dieta equilibrada, aumentar el consumo de alimentos de origen vegetal (aceites de oliva, soja, onagra, etc., y frutos secos) así como un mayor consumo de pescado azul, siendo muy importante disminuir la ingesta de grasas animales y productos procesados [1,2].

Desde épocas prehistóricas las nueces son consideradas un alimento valioso siendo actualmente un importante componente de la dieta mediterránea y vegetariana debido a sus excelentes propiedades organolépticas y por ser una potente fuente de nutrientes. De hecho, las nueces destacan por su alto contenido en lípidos que varía de un 64 a un 72%, siendo los principales ácidos grasos de la nuez de tipo poliinsaturado tales como el linoleico ($\omega 6$) y el α -linolénico ($\omega 3$) que implican importantes beneficios para la salud, como la reducción del colesterol, la disminución de la presión arterial, así como la mejora del perfil lipídico en la sangre [3–5].

Además, las nueces son una buena fuente de vitaminas B1, B2, B3 y especialmente B6, así como de vitaminas del grupo E. Tienen un alto contenido en proteínas (24%), ricas en el aminoácido L-arginina, relacionado con la prevención de enfermedades cardiovasculares. Contienen también fibra (1,5-2%) que ayuda al tránsito intestinal y presentan capacidad antioxidante debida a la presencia de polifenoles (0,28%). Además, poseen un alto contenido en macroelementos como potasio, magnesio, calcio y fósforo, necesarios para regular la presión arterial y el desarrollo correcto del esqueleto, así como un bajo contenido en sodio que hacen de las nueces un alimento beneficioso para la salud [4–8].

En la Figura 1 se muestra el esquema hipotético de la ingesta de grasas totales y grasas saturadas e insaturadas a lo largo del tiempo. Los datos se extrapolaron a partir de análisis transversales de poblaciones contemporáneas de cazadores-recolectores y de otros estudios antropológicos realizados durante los últimos años. Como puede observarse, los aspectos evolutivos de la dieta indican que se han producido cambios importantes, particularmente en el



tipo y la cantidad de ácidos grasos esenciales, así como en el contenido antioxidante de los alimentos [9–12].

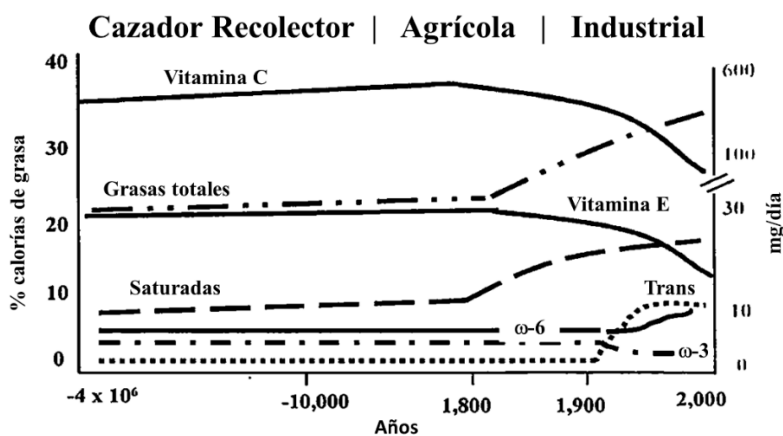


Figura 1. Esquema hipotético de la evolución en la ingesta de grasas saturadas y totales, ácidos grasos $\omega 3$ y $\omega 6$ y vitaminas E y C [13].

3.1. Ácidos grasos presentes en las nueces

Las nueces contienen dos ácidos grasos poliinsaturados, el ácido α -linolénico y el ácido linoleico, un ácido graso monoinsaturado, el ácido oleico y dos ácidos grasos saturados, el ácido esteárico y ácido palmítico [14–16]. A continuación, se comentarán sus principales características e importancia en la dieta.

3.1.1. Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga

Los ácidos grasos α -linolénico ($\omega 3$) y linoleico ($\omega 6$) son los principales ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga presentes en las nueces. Ambos tienen 18 átomos de carbono y presentan 3 y 2 insaturaciones, respectivamente. A la hora de formular los ácidos grasos se suele utilizar una forma abreviada de notación en la que se indica el número de átomos de carbono, el número de dobles enlaces, la posición de éstos y su estereoquímica (c = cis, t = trans). Así, por ejemplo, el ácido α -linolénico se describiría como 18:3 (9c, 12c, 15c) en la nomenclatura clásica (Figura 2). Recientemente, se ha popularizado una nomenclatura de los ácidos grasos en la que se numeran los dobles enlaces contando el número de carbonos existentes a partir del metilo terminal (denominado ω). Así, el ácido α -linolénico ($\omega 3$) será el que posee un doble enlace a tres carbonos del final y se describiría como 18:3 (3c, 6c, 9c). En este trabajo se empleará la nomenclatura omega simplificada indicando únicamente el número de carbonos, número de insaturaciones y posición de la primera insaturación, de la siguiente forma: C18:3n3.

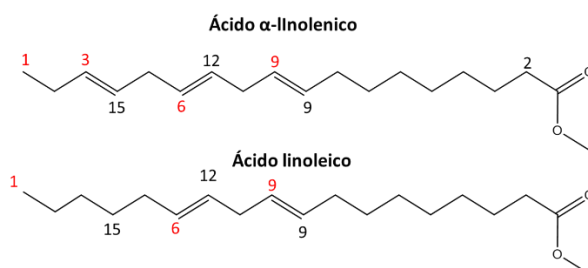


Figura 2. Nomenclatura clásica (en negro) y omega (en rojo) de los ácidos grasos α -linolénico y linoleico

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga juegan un papel importante en nuestro organismo. Estos ácidos grasos pueden propiciar tanto una respuesta inflamatoria como antiinflamatoria. Hay que destacar que un exceso de inflamación dificulta la circulación y distribución de las diversas sustancias por el organismo [17–19].

Ambos ácidos grasos, α -linolénico ($\omega 3$) y linoleico ($\omega 6$) son esenciales para el ser humano pues nuestro organismo no puede biosintetizarlos ya que no disponemos de las rutas enzimáticas necesarias, por lo que hay que incorporarlos a través de la dieta. En el grupo de los ácidos grasos $\omega 3$ el ácido α -linolénico (C18:3) es el más importante, ya que a través de la acción de enzimas desaturasas y elongasas se transforma en el ácido eicosapentaenoico (C20:5, EPA) y posteriormente en el ácido docosahexaenoico (C22:6, DHA). Por su parte, en el grupo de los ácidos grasos $\omega 6$ destacan el ácido linoleico (C18:2) y uno de sus derivados más importantes como el ácido araquidónico (C20:4, AA). En la Figura 3 se muestra un esquema de la transformación de los ácidos α -linolénico y linoleico en sus derivados de cadena más larga. Estos tres ácidos grasos (EPA, DHA y AA) son importantes en el metabolismo celular y forman parte de los fosfolípidos de las membranas. El EPA y DHA tienen efectos antiinflamatorios, cardioprotectores y neuroprotectores, así como son responsables de la prevención de diabetes, artritis, hipertensión y cáncer [1,20].

Las fuentes nutricionales de los ácidos linoleico y α -linolénico son los alimentos de origen vegetal especialmente aceites y frutos secos. Sin embargo, la fuente de sus derivados (EPA, DHA y AA) son los alimentos de origen animal (el AA se encuentra en las carnes de vacuno, cerdo y cordero, y el EPA y DHA principalmente en pescados grasos) [1]. Debido a que solo una parte del α -linolénico se convierte en EPA y DHA en dietas vegetarianas está recomendada la incorporación de complementos nutricionales que contengan estos ácidos grasos [21].

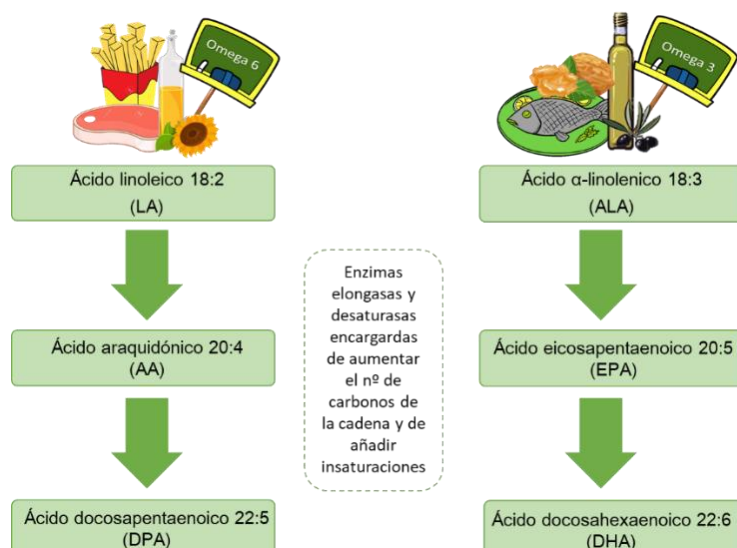


Figura 3. Transformación que sufren los ácidos grasos esenciales en el organismo

En la bibliografía se ha comentado profusamente acerca de las virtudes de una dieta rica en ácidos grasos $\omega 3$ y $\omega 6$, pero se comenta poco la necesidad de que exista una correcta relación entre estos dos grupos de ácidos grasos para que la respuesta inflamatoria o bien antiinflamatoria sea la adecuada [1,13]. En líneas generales, los ácidos grasos $\omega 3$ son inhibidores de la inflamación, en cambio los ácidos grasos $\omega 6$ son activadores de la inflamación. Cuando en las membranas celulares priman los ácidos grasos $\omega 6$ muy por encima de los ácidos grasos $\omega 3$, se tiende a una respuesta inflamatoria exagerada al mínimo aviso del sistema inmunitario o bien a un estado inflamatorio constante. Lo recomendable es que la proporción $\omega 6/\omega 3$ sea de 2:1 a 5:1 como máximo en las membranas celulares. Por ello, es importante resaltar que el papel de los ácidos grasos $\omega 6$ no es perjudicial para la salud, siempre que exista una correlación adecuada con los ácidos grasos $\omega 3$ [13].

Actualmente, en las dietas occidentales la relación entre ácidos grasos $\omega 6/\omega 3$ varía entre 10:1 y 20:1 en lugar del rango óptimo de 2:1 a 5:1. Esto es debido a una menor ingesta de ácidos grasos $\omega 3$ por la disminución en el consumo de pescado y la producción industrial de piensos con altos contenidos en ácidos grasos $\omega 6$, lo que conlleva a la producción de una carne rica en $\omega 6$ y pobre en $\omega 3$. Incluso, el contenido en $\omega 3$ de las verduras cultivadas es menor que en las silvestres. En definitiva, la agricultura moderna ha disminuido el contenido en $\omega 3$ de muchos alimentos [13,20]. Sin embargo, si se sigue una dieta variada, con menos carnes rojas y embutidos, así como más pescados grasos, verduras y frutos secos, mantendremos una relación equilibrada y capaz de regular los procesos inflamatorios. Por ello, sería de interés que en las etiquetas de los alimentos



apareciera información sobre los contenidos de $\omega 3$ y $\omega 6$ debido a sus diferentes funciones metabólicas. En consecuencia, el cálculo de la relación de ácidos grasos poliinsaturados $\omega 6/\omega 3$ es de gran relevancia ya que se trata de un indicativo importante de salud [13].

3.1.2. Ácidos grasos monoinsaturados de cadena larga

Las nueces contienen ácido oleico (C18:1) que es uno de los ácidos grasos monoinsaturados más representativo de la serie omega9 ($\omega 9$) con un único doble enlace situado en la posición 9 desde el carbono terminal (Figura 4). El ácido oleico está presente en la dieta mediterránea en alimentos como el aceite de oliva o en frutos secos como las nueces o las almendras. A diferencia de los ácidos grasos $\omega 3$ y $\omega 6$, el ácido oleico no es esencial ya que los seres humanos podemos sintetizarlo a partir del ácido esteárico catalizado por enzimas desaturasas [22]. A pesar de no ser esencial posee importantes cualidades beneficiosas para el organismo humano. Numerosos estudios han demostrado su importante acción preventiva de la diabetes tipo II [23,24]. Las dietas ricas en $\omega 9$ están asociadas con la reducción de la ira y la irritabilidad y reduce el dolor en pacientes con artritis inflamatoria [25].

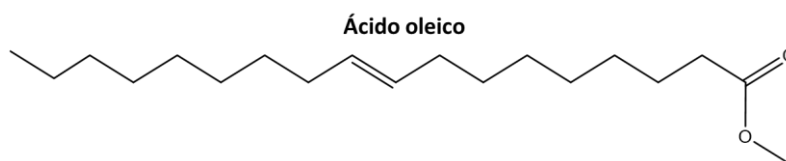


Figura 4. Estructura del ácido oleico

3.1.3. Ácidos grasos saturados de cadena larga

Las nueces contienen ácidos grasos saturados de cadena larga y éstos constituyen una importante fuente de energía del organismo, son necesarios para la absorción de vitaminas liposolubles y forman parte de las membranas celulares. Sin embargo, los ácidos grasos saturados también se caracterizan por no ser saludables debido a sus efectos negativos sobre el metabolismo del colesterol y la obesidad. En estudios epidemiológicos se ha comprobado que la ingesta de grasa saturada aumenta los niveles de colesterol en sangre. Por ello, las autoridades sanitarias recomiendan una ingesta limitada de ácidos grasos saturados [26,27]. Estos ácidos carecen de dobles enlaces y por este motivo la mayor parte de las grasas saturadas se mantienen en estado sólido a temperatura ambiente. En las nueces se encuentran presentes los ácidos grasos saturados esteárico (C18:0) y palmítico (C16:0) (Figura 5). El ácido esteárico no eleva los niveles plasmáticos de colesterol total según estudios realizados en animales y humanos. Este



ácido se metaboliza más rápidamente que otras grasas saturadas transformándose en ácido oleico ($\omega 9$). Por su parte, el ácido palmítico debe su nombre al aceite de palma dado que es el componente principal del mismo. Un consumo excesivo de este ácido está asociado con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. Estudios recientes muestran cierta controversia en relación al efecto cancerígeno de este ácido graso [28,29].

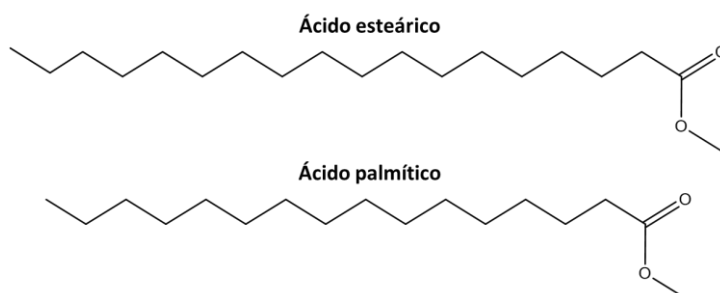


Figura 5. Estructuras químicas de los ácidos esteárico y palmítico

3.2. Extracción de los ácidos grasos presentes en las muestras de nueces

El aceite de semillas se ha convertido últimamente en un producto muy demandado por su gran valor nutricional y sus particulares funciones saludables. Estos aceites pueden ser empleados en la industria alimentaria y cosmética aportando un valor añadido a los productos que lo contienen. El contenido en aceite de las nueces es de aproximadamente el 65%, mayor que el de otros frutos secos como las almendras (53%) o los pistachos (50%) [30–32]. Aproximadamente el 11% de este aceite total es ácido α -linolénico, que es también más alto que en otros frutos secos [14,33]. Por ello, es de gran importancia el disponer de métodos sencillos y rápidos que permitan la extracción de estos ácidos grasos de las nueces.

La extracción es una etapa crucial para el aislamiento y separación de los compuestos de interés presentes en la matriz de la muestra. El procedimiento para llevar a cabo la extracción de los ácidos grasos de muestras sólidas se basa en una extracción sólido-líquido en continuo, empleando un disolvente, con posterior evaporación de éste y pesada final del aceite. Esta extracción consiste en la transferencia selectiva de las especies de interés que se encuentran en la matriz sólida hacia la fase líquida con la que se pone en contacto, basándose en las diferencias de solubilidad [34]. El aceite de nueces y semillas puede ser extraído con disolventes como el hexano, éter de petróleo o acetato de etilo con los que se puede recuperar hasta un 70% del contenido graso [30].



La extracción Soxhlet es el método oficial de extracción de muestras sólidas más utilizado en la etapa de preparación de la muestra, y actualmente, es el principal método de referencia con el que se comparan otros métodos de extracción. Además, muchos métodos de la EPA (U.S. *Environmental Protection Agency*) y de la FDA (*Food and Drugs Administration*) utilizan esta técnica clásica como método oficial para la extracción en continuo de sólidos. La extracción con Soxhlet presenta ventajas ya que la muestra entra en contacto repetidas veces con porciones frescas de disolvente y se realiza con el disolvente en caliente, favoreciendo la solubilidad de los analitos, la metodología empleada es muy simple, el método no depende de la matriz, y se obtienen excelentes recuperaciones.

Sin embargo, el empleo de este método convencional de extracción conlleva limitaciones tales como largos periodos de tiempo (6-24 horas), no es posible la agitación del sistema, lo que podría acelerar el proceso de extracción, riesgos tanto medio ambientales como riesgos para la salud del operador, alto consumo de disolvente (50-300 mL), la descomposición térmica de los analitos termolábiles y posibles cambios en las características del aceite extraído. Además, es necesaria una etapa final de evaporación del disolvente para la concentración de los analitos por lo que esta técnica no es fácilmente automatizable [35].

Por ello, en los últimos años, se han empleado nuevas metodologías de extracción como la extracción asistida por ultrasonidos, la extracción asistida por microondas, la extracción mediante fluidos presurizados o la extracción mediante fluidos supercríticos [36–39]. Estas técnicas son consideradas alternativas verdes que han sido ampliamente utilizadas para la extracción de compuestos fenólicos y antocianinas en diversos tipos de frutos [36,37,40,41]. Estas nuevas técnicas presentan ventajas frente a los métodos convencionales debido a su sencillez, rendimientos de extracción, rapidez, además de un menor consumo de disolvente [34,42,43].

La extracción asistida por ultrasonidos es una técnica ampliamente empleada para la extracción de compuestos presentes en matrices vegetales [41,44]. Dicho método de extracción funciona siguiendo un mecanismo de cavitación, un fenómeno que consiste en la generación de burbujas de diminuto tamaño que generan pequeñas explosiones responsables de causar la ruptura de la pared celular de las células vegetales. La degradación de la pared celular permite que el disolvente penetre dentro de la matriz de la muestra vegetal y por tanto se origine la liberación del contenido intracelular [42,44].



3.3. Determinación de ácidos grasos mediante cromatografía de gases con ionización de llama (FID)

El contenido de materia grasa es uno de los parámetros analíticos de interés en los productos destinados a la alimentación y, en consecuencia, su determinación es muy habitual. Se han encontrado en la bibliografía varios métodos para la determinación de ácidos grasos en alimentos como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) [45,46], resonancia magnética nuclear (RMN) [47,48] o electroforesis capilar (CE) [49]. De entre todas ellas, la cromatografía de gases es la técnica más empleada y aceptada para la determinación de ácidos grasos.

La cromatografía de gases (CG) es una de las técnicas analíticas más empleadas para la determinación de compuestos orgánicos. La cromatografía de gases es una técnica sensible, que requiere poca cantidad de muestra para el análisis (del orden de los μL) y que proporciona una alta resolución, siendo capaz de detectar concentraciones a niveles de ppm y a menudo ppb [50]. Es interesante destacar que esta técnica posee un amplio rango de aplicaciones tales como la realización de controles de calidad de productos farmacéuticos, el análisis de drogas, determinación de la presencia de contaminantes en el medio ambiente y análisis de alimentos, entre otras [51].

El cromatógrafo de gases consta principalmente de un inyector para introducir la muestra en el sistema, una columna en la que se separan los distintos componentes de la muestra según su afinidad por la fase estacionaria, un horno para suministrar calor a la columna y un detector que proporciona la señal analítica (Figura 6).

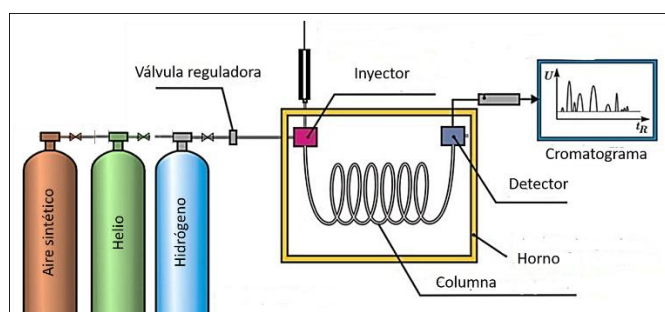


Figura 6. Esquema en el que aparecen los elementos presentes en el cromatógrafo de gases

El dispositivo de inyección es la parte encargada de vaporizar la muestra a analizar e incorporarla a la corriente del gas portador que se dirige hacia la columna. Este dispositivo de inyección está formado por un bloque metálico que debe ser buen conductor del calor, un termostato capaz de mantener su temperatura constante y un aislamiento térmico adecuado.



La columna es una de las partes más importantes de un cromatógrafo de gases. Contiene la fase estacionaria y efectúa la separación de los componentes de la mezcla. La clave de una buena separación cromatográfica es usar la fase estacionaria más adecuada. Las fases estacionarias se dividen en polares, como el Polietilenglicol, y no polares, como el Polidimetilsiloxano (PDMS) [52]. En cromatografía de gases se usan dos tipos generales de columnas las empaquetadas o de relleno y las tubulares abiertas o capilares [53].

La temperatura de la columna es una variable importante por lo que el cromatógrafo de gases debe de disponer de un horno de calentamiento. El horno es el encargado de mantener a la columna a una temperatura fijada con precisión de décimas de grado y debe ser capaz de incrementar la temperatura a una velocidad prefijada y constante. A menudo, es conveniente emplear un programa para aumentar la temperatura de la columna bien de forma continua bien por etapas, al mismo tiempo que tiene lugar la separación [53]. Finalmente, los componentes serán caracterizados según sus tiempos de retención.

En cromatografía de gases uno de los sistemas de detección más empleados es el detector de ionización de llama (FID). En estos dispositivos, el gas que sale al final de la columna pasa por una fuente de ionización y causa entre los electrodos una corriente eléctrica que es la responsable de dar lugar a la señal analítica [54]. Este tipo de detectores responden a todos los compuestos orgánicos, mientras que los compuestos de tipo inorgánico no originan ninguna respuesta cuantitativa. Además, generan cromatogramas con una línea base estable que no se ven afectados por fluctuaciones en la temperatura o variaciones en el flujo y presión de gas portador, pudiéndose detectar un amplio rango de concentraciones [52,54,55].

Para que el análisis por cromatografía de gases se lleve a cabo de forma satisfactoria es necesario que la muestra sea de carácter volátil. En el caso particular de los ácidos grasos, estos suelen tener un alto punto de ebullición, que aumenta a medida que se incrementa el número de carbonos de la cadena. Por ello, se hace necesaria la transformación o derivatización de los ácidos grasos a una forma en la que sea posible su medida mediante CG, es decir, transformar el ácido graso en su éster metílico correspondiente [54].

3.4. Antecedentes bibliográficos

Tras realizar una revisión bibliográfica sobre la determinación de ácidos grasos en nueces, se encontraron 6 artículos en los que se determinan ácidos grasos en las mismas. En uno de ellos



se determinó el contenido en ácidos grasos de nueces de cultivos procedentes del noreste de Italia, extrayendo previamente el aceite con éter de petróleo mediante sistema Soxhlet y analizando los ésteres metílicos mediante cromatografía de gases con ionización de llama (GC-FID) [56]. En otro artículo se determinó el perfil de ácidos grasos, el contenido en tocoferol y la actividad antioxidante en nueces de Persia. Se llevó a cabo la extracción del aceite con hexano simplemente mediante agitación ocasional y de forma manual durante 2 horas. Los ésteres de los ácidos grasos presentes en el aceite extraído se determinaron mediante GC-FID. En este artículo se encontró que las nueces pertenecientes a la especie *Juglans Ailantifolia* poseían un mayor contenido en ácido linoleico y un menor contenido en ácidos grasos en comparación con las nueces pertenecientes a la especie *Juglans Regia* [57]. Otra publicación realizó la determinación de ácidos grasos en aceites vegetales mediante electroforesis capilar (EC) y comparó esta técnica con la cromatografía de gases obteniendo resultados muy similares entre ambas [49].

Se han encontrado también diversas investigaciones donde se analizaron muestras de nueces españolas por CG-FID. En un artículo se publicó una caracterización del aceite de nueces procedentes de Asturias extraído mediante Soxhlet [58]. En otra investigación se analizó la composición nutricional de nueces Españolas y de otros países de cosechas desde 2013 hasta 2017 [59]. Se realizó una extracción del aceite de nueces mediante Soxhlet y la composición de ácidos grasos sugirió que estas nueces presentan una mayor cantidad de ácidos grasos monoinsaturados y una menor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados por lo que son más estables frente a la oxidación. Por último, en otro artículo en el que se pretende comprobar si existen diferencias entre nueces de distintas cosechas y genotipos se realiza un análisis de muestras de nueces de distinto origen [60]. El aceite de nueces en este artículo se obtuvo mediante extracción por prensa hidráulica y se observó que el año de cosecha tenía mayor influencia en la composición lipídica que el genotipo.

Con lo expuesto anteriormente, se consideró de gran interés adaptar un método de extracción asistido por ultrasonidos para el caso específico de nueces, para posteriormente determinar por CG-FID los porcentajes de ácidos grasos de nueces de distintos orígenes geográficos y que se encuentran al alcance del consumidor.



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Reactivos

Los reactivos utilizados fueron de calidad para análisis y todos ellos aparecen reflejados en la Tabla 1.

Tabla 1. Materiales y reactivos empleados

Nombre	Pureza	Casa comercial
Hexano	95%	Panreac (Barcelona, España)
Sulfato de sodio anhidro	99%	Merck (Darmstadt, Alemania)
Metanol	99,5%	Panreac (Barcelona, España)
Hidróxido de potasio	85%	Panreac (Barcelona, España)
Ácido Heptadecanoico	99%	Sigma (Barcelona, España)
Supelco 37 FAME MIX	Patrón	Merck (Darmstadt, Alemania)
Ácido Sulfúrico	96%	Merck (Darmstadt, Alemania)
Ciclohexano	99,9%	Panreac (Barcelona, España)

4.2. Instrumentación

La extracción de los ácidos grasos mediante ultrasonidos se llevó a cabo en un baño de ultrasonidos de 700 W de la marca P-selecta. El análisis de los ésteres metilados por cromatografía de gases se llevó a cabo en un cromatógrafo Thermo Scientific Modelo GC Focus Series (Milán, Italia) que aparece en la Figura 7. Para estos estudios se utilizó helio como gas portador y un detector de ionización de llama de hidrógeno. La columna utilizada fue una columna cromatográfica TRACE TR-WAX de polietilenglicol (fase polar) de 60 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μm de espesor de película.



Figura 7. Cromatógrafo de gases con muestreador automático



4.3. Toma de muestra

Para el presente estudio se han tomado un total de 12 muestras de nueces, 1 muestra de aceite de nueces de origen Francia y 1 muestra de almendra de origen España que se encontraban al alcance del consumidor (Tabla 2). En concreto, las 12 muestras de nueces que se han analizado pertenecen a la especie *Juglans Regia* de la familia Juglandaceae, procedentes de 12 cultivos diferentes de distintos orígenes geográficos (España, Francia, Estados Unidos (EEUU) y Chile).

Tabla 2. Datos de las muestras analizadas

Nº de muestra	Tipo de muestra	Origen	Año Cosecha
1	Nuez	Albacete, España 1	2018
2	Nuez	Albacete, España 2	2018
3	Nuez	Cáceres, España	2018
4	Nuez	Jerez, España	2018
5	Nuez	Lleida, España	2018
6	Nuez	Chile 1	2018
7	Nuez	Chile 2	2019
8	Nuez	EEUU 1	2018
9	Nuez	EEUU 2	2018
10	Nuez	Francia 1	2018
11	Nuez	Francia 2	2018
12	Nuez	Francia 3	2018
13	Aceite de nuez	Francia	2018
14	Almendra	España	2018

4.4. Extracción de los ácidos grasos presentes en la nuez

En este trabajo se han utilizado dos procedimientos de extracción del aceite de las nueces. El primero implica una extracción mediante un sistema Soxhlet y el segundo implica la extracción del aceite de las nueces haciendo uso de los ultrasonidos.

4.4.1. Extracción mediante sistema soxhlet

Se pesaron 12,5 gramos de nueces previamente trituradas en un molinillo (Aigostar Breath, Madrid) y se introdujeron en un cartucho de papel. Se introdujo el cartucho dentro del extractor soxhlet. En un matraz de fondo redondo de 500 mL, se añadió 250 mL de hexano y trozos de plato poroso. Además, se añadió aproximadamente 150 mL más de hexano en el extractor soxhlet con el fin de acelerar el proceso. Se colocó el matraz de fondo redondo junto con el extractor soxhlet y el refrigerador sobre una manta calefactora como puede observarse en la Figura 8 y se calentó aproximadamente a 60 °C durante 12 horas. Posteriormente, se filtró el



contenido del matraz de fondo redondo, y se llevó a sequedad en un rotavapor. Finalmente, se pesaron en el matraz de fondo redondo y por diferencia de pesada se obtuvo el porcentaje de aceite extraído.

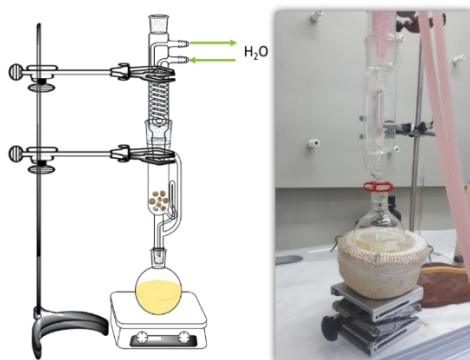


Figura 8. Sistema de montaje soxhlet. A la izquierda aparece el esquema del montaje y a la derecha la fotografía del sistema donde se realizó la extracción.

4.4.2. Extracción mediante sistema de ultrasonidos

Se pesaron 5 gramos de nueces en un matraz de fondo redondo, se añadieron 50 mL de hexano y se dejó reposar durante 1 hora. Se introdujo el matraz en un baño de ultrasonidos y se colocó un refrigerante en la parte superior del matraz. Posteriormente, se aplicó la energía de ultrasonidos durante 30 minutos a una potencia de 700 W como se muestra en la Figura 9. Una vez finalizada la extracción, se separó el líquido y se centrifugó durante 10 minutos a 4000 rpm. Tras finalizar la centrifugación, se enrasó a 50 mL con hexano. Los extractos obtenidos se guardaron en botes ámbar de vidrio a temperatura ambiente hasta el momento de realizar el análisis [61].

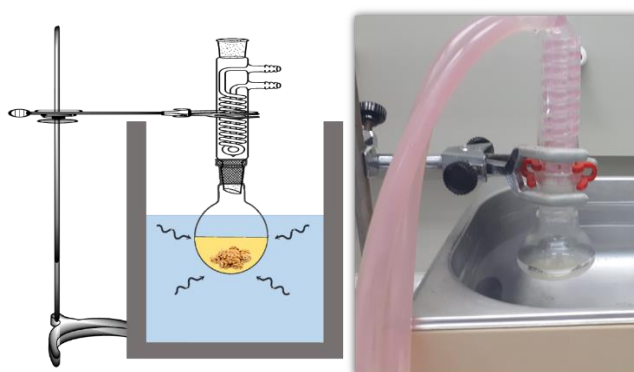


Figura 9. Sistema de extracción con ultrasonidos. A la izquierda aparece el esquema del montaje y a la derecha la fotografía del sistema de extracción asistido por ultrasonidos.



4.5. Derivatización de las muestras. Metilación de los ácidos grasos presentes en el aceite de nuez

Se tomaron 100 μ L del extracto de aceite de nueces, se añadieron 2 mL de patrón interno (ácido heptadecanoico, HDA), se añadieron 4 mL de hexano y se agitó en vortex durante 1 minuto con el fin de disolver el aceite. Se añadieron 0,5 mL de una disolución de hidróxido de potasio en metanol 2 M y se agitó de nuevo en vortex durante 5 minutos. La mezcla resultante se centrifugó durante 5 minutos a 3000 rpm. Se tomaron 2 mL de la fase sobrenadante que contiene los ésteres metilados y se enrasó a 5 mL con hexano. Finalmente, se tomó una alícuota de la disolución de los ésteres en hexano y se guardó en viales ámbar de vidrio de 2 mL hasta el momento de realizar el análisis [62].

4.6. Determinación de ácidos grasos metilados por cromatografía de gases

Se inyectó 1 μ L de la muestra de los ésteres de los ácidos grasos en el cromatógrafo de gases y se sometió al siguiente programa de calentamiento que implica una primera rampa diseñada para la separación cromatográfica con una pendiente 5 $^{\circ}$ C/min a una temperatura máxima de 220 $^{\circ}$ C y con un tiempo de espera de 15 minutos. La segunda rampa para la limpieza de los restos que pudiesen quedar en la columna implica una pendiente de 40 $^{\circ}$ C/min, con una temperatura máxima de 250 $^{\circ}$ C y un tiempo de espera de 2 minutos. El gas portador utilizado fue Helio y se inyectó con un caudal de 1 mL/min.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Extracción del aceite de las muestras de nueces

Para determinar el porcentaje de ácidos grasos en nueces mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama se hace necesaria la extracción del contenido graso que forma parte de la matriz de la muestra. En la bibliografía se pueden encontrar diversas referencias para llevar a cabo la extracción de ácidos grasos en diferentes tipos de alimentos, tales como la extracción con soxhlet, extracción con ultrasonidos, extracción asistida con microondas, etc [42,43,61]. En este trabajo comenzamos aplicando la extracción con soxhlet dado que existen publicados varios artículos que utilizan esta metodología para extraer el aceite de muestras de nueces [56,58,59]

En primer lugar, se trituró suficiente cantidad de nueces de la muestra #1 haciendo uso de un molinillo hasta obtener un granulado uniforme. Para cada extracción se pesaron 12,5 g de las nueces trituradas y se colocaron en un cartucho de papel de filtro. El disolvente seleccionado para



la extracción fue hexano dado que es el más ampliamente utilizado para este tipo de muestras [30]. En un matraz de fondo redondo de 500 mL se adicionaron 250 mL de hexano, unos trozos de porcelana porosa y aproximadamente 150 mL más de hexano en el extractor para acelerar el proceso. La extracción se llevó a cabo durante 12 horas a una temperatura aproximada de 60 °C [63,64]. Una vez finalizado el tiempo de extracción se eliminaron los trozos de porcelana filtrando el contenido del matraz de fondo redondo, posteriormente, se eliminó el exceso de hexano llevándolo a sequedad en un rotavapor. Como resultado se obtuvo un aceite de color amarillo pálido siendo el porcentaje de aceite extraído del 73,2 %. Utilizando el mismo procedimiento comentado anteriormente se realizó otra extracción durante 7 horas con la finalidad de evaluar el porcentaje de extracción para este tiempo. En este caso se obtuvo un porcentaje de extracción del 65,2 %. Estos porcentajes concuerdan con los publicados en la bibliografía para muestras de nueces [3,31,32,65].

Debido a que la extracción mediante soxhlet implica el uso de grandes volúmenes de disolvente y conlleva tiempos largos de extracción, se evaluó la posibilidad de modificar un método publicado para la extracción de aceite de nueces de macadamia asistido por ultrasonidos y adaptarlo a las nueces que se analizan en el presente trabajo [61]. En este caso, en un matraz de fondo redondo de 100 mL se pesaron 5 g de la muestra #1 triturada, se adicionó 50 mL de hexano y se dejó reposar por un tiempo [61]. Posteriormente, se colocó un refrigerante en la parte superior del matraz de fondo redondo con la finalidad de evitar posibles pérdidas de disolvente durante la extracción. Se introdujo el sistema en el baño de ultrasonidos y se llevaron a cabo tres extracciones con duraciones de 20, 30 y 45 minutos por triplicado y utilizando una potencia de 700 w en todos los casos. Al finalizar el tiempo de extracción se separó el sólido del extracto mediante un proceso de centrifugación a 4000 rpm durante 10, 20 y 30 minutos, observándose que con 10 minutos el sólido se separaba bien del extracto. Se recuperó el extracto llevándolo a sequedad en un rotavapor [61]. Los resultados de las extracciones a diferentes tiempos mostraron que con 30 minutos de extracción se consigue un porcentaje del 55,8% con un coeficiente de variación del 2,1%, siendo este resultado prácticamente igual al obtenido con 45 minutos y coincidiendo con los publicados en la bibliografía para muestras de nueces [61].

En este punto, se planteó incrementar el porcentaje de aceite extraído por el método de ultrasonidos. Para ello, se diseñaron dos tipos de experiencias utilizando de nuevo hexano como disolvente y 5 gramos de nueces trituradas. En la primera experiencia se realizó una extracción



aumentando el volumen de disolvente hasta 75 mL durante 30 minutos y manteniendo las mismas condiciones de separación del sólido y el extractante que en el caso anteriormente descrito. El porcentaje de aceite extraído fue del 59,1 %. En la segunda experiencia se llevó a cabo el procedimiento de extracciones sucesivas. Se realizó una primera etapa de extracción con 50 mL de hexano durante 15 minutos, se separó el sólido del extracto y sobre el sólido se realizó una segunda extracción con 25 mL de disolvente durante 15 minutos. El porcentaje de aceite recuperado en esta extracción sucesiva fue del 62,2 %. Estos resultados indican, como era de esperar que, para el mismo volumen de disolvente utilizado y tiempo de extracción, la extracción sucesiva es algo más eficiente. No obstante, en estas dos últimas experiencias donde se utiliza un mayor volumen de disolvente, el porcentaje de aceite extraído no es sustancialmente superior al obtenido con 50 mL de hexano durante 30 minutos en una sola etapa. Los dos últimos procedimientos implican un mayor consumo de disolvente y una mayor manipulación de las muestras, por lo que se seleccionó el procedimiento de una sola etapa y menor volumen de disolvente para llevar a cabo las extracciones de ácidos grasos de las nueces analizadas en este trabajo. No obstante, con la finalidad de evaluar la cantidad máxima de aceite que puede extraerse con el procedimiento de extracciones sucesivas asistido por ultrasonidos, se llevaron a cabo tres extracciones sucesivas con 50 mL de hexano sobre 5 gramos de nueces con una duración de 30 minutos. Tras la segunda y tercera extracción solo se recuperan 0,22 y 0,07 g más de aceite, respectivamente. Estos resultados indican que haciendo uso de los ultrasonidos la primera etapa de las extracciones sucesivas recupera casi la totalidad del aceite.

5.2. Determinación de ácidos grasos mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID)

Para realizar la determinación del porcentaje de ácidos grasos en las muestras de nueces por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) se utilizó la columna cromatográfica TRACE TR-WAX de polietilenglicol (fase polar) de 60 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μm de espesor de película. Esta columna es adecuada para la separación de ésteres, alcoholes, cetonas, etc [66].

Para optimizar el programa de temperatura y realizar la separación cromatográfica es necesario derivatizar los ácidos grasos y formar ésteres metílicos volátiles mediante una reacción de esterificación. En la bibliografía existen diversos procedimientos para convertir los ácidos grasos en sus correspondientes esteres metílicos [67,68]. Se seleccionó el procedimiento en



medio básico por ser una metodología más rápida y sencilla que conlleva la adición de 0,5 mL de una disolución 2 M de KOH en metanol y 4 mL de hexano a 60 mg de aceite de nuez en hexano [62]. La mezcla se agitó usando un vortex durante 5 minutos y centrifugando durante otros 5 minutos para finalmente separar por decantación los ésteres metílicos.

Una vez que se obtuvieron los esteres de los ácidos grasos de la muestra #1, se optimizó el programa de temperatura de la separación cromatográfica. Se partió del programa de temperatura 1 mostrado en la Tabla 3 y que es el recomendado para este tipo de columna y este tipo de muestras [66]. Este programa consta de dos rampas, la rampa nº1 para la separación cromatográfica y la rampa nº2 para la limpieza de los posibles restos que puedan quedar en la columna antes de la siguiente inyección. Se inyectó en el cromatógrafo 1 µL de la muestra #1 derivatizada en medio básico y el cromatograma correspondiente se muestra en la Figura 10.

Tabla 3. Programa de temperatura 1 para la separación cromatográfica

Programa de temperatura 1			
	Pendiente (°C/min)	T (°C)	Tiempo de espera (min)
Inicial		50	2
Rampa nº1	4	220	15
Rampa nº2	40	250	4

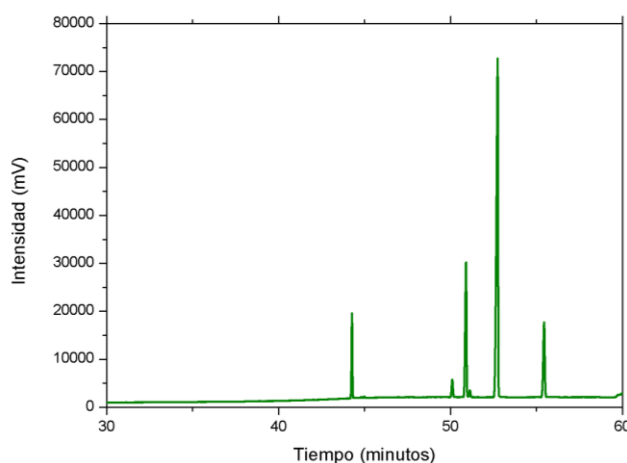


Figura 10. Cromatograma de la muestra #1 utilizando el programa de temperatura 1

A la vista del cromatograma que aparece en la Figura 10 se obtienen 5 picos que muestran buena separación cromatográfica en un tiempo total de 57,25 minutos con una sensibilidad adecuada. Seguidamente se modificaron algunos parámetros del programa de temperatura tales como la rampa de calentamiento, la temperatura máxima y el tiempo de espera con la finalidad de reducir el tiempo de separación y mejorar si era posible la resolución cromatográfica. En la



Tabla 4 se muestran los programas de temperaturas ensayados y en la Figura 11 los cromatogramas correspondientes a cada programa de temperatura.

Tabla 4. Programas de temperatura para la separación cromatográfica

Programa de temperatura 2			
	Pendiente (°C/minutos)	T (°C)	Tiempo de espera (minutos)
Inicial		50	2
Rampa nº1	5	240	15
Rampa nº2	40	250	2
Programa de temperatura 3			
	Pendiente (°C/minutos)	T (°C)	Tiempo de espera (minutos)
Inicial		50	2
Rampa nº1	5	220	15
Rampa nº2	40	250	2
Programa de temperatura 4			
	Pendiente (°C/minutos)	T (°C)	Tiempo de espera (minutos)
Inicial		50	4
Rampa nº1	3	220	15
Rampa nº2	40	250	2

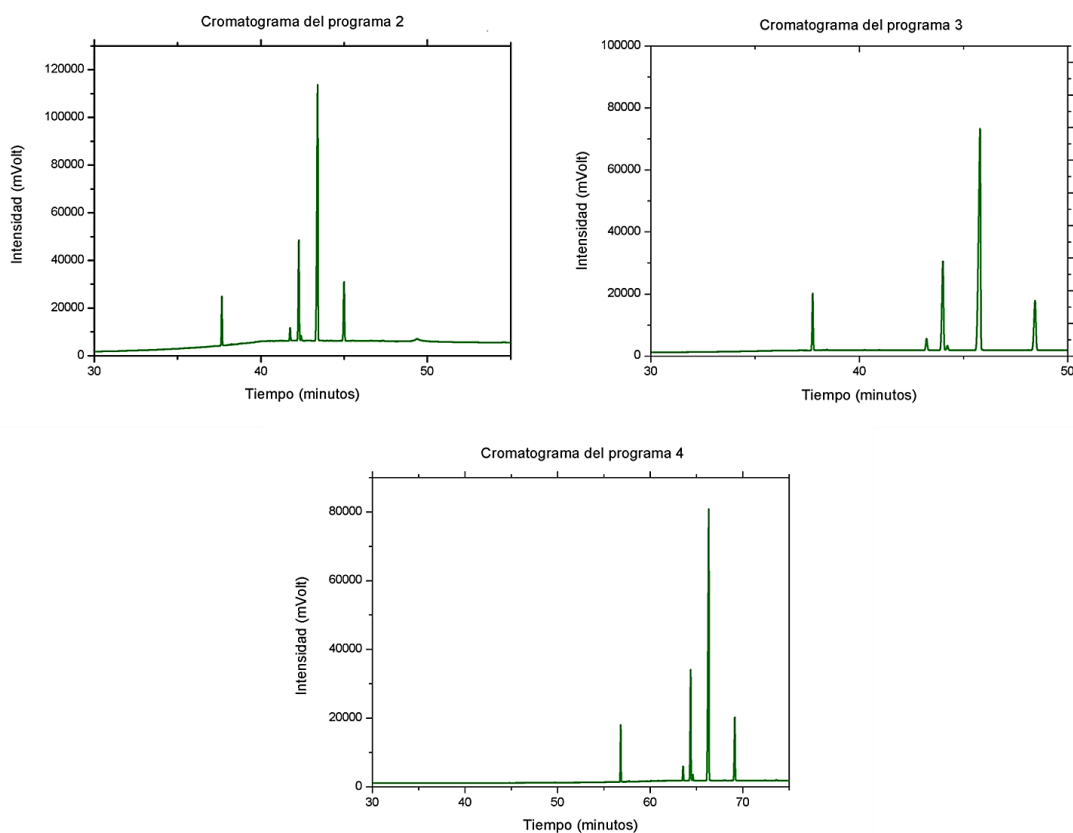


Figura 11. Cromatogramas correspondientes a los programas 2, 3 y 4 de temperatura



Como puede observarse, en todos los casos aparecen 5 picos en los cromatogramas siendo el programa de temperatura 3 el que implica una mayor separación de los picos en comparación con los restantes programas de temperatura. Por lo tanto, el programa de temperatura 3 se seleccionó para llevar a cabo la separación cromatográfica de los ésteres metílicos de los ácidos grasos presentes en el aceite extraído de las nueces analizadas en este trabajo.

El siguiente paso fue identificar los picos que aparecen en los cromatogramas. Para ello se utilizó el patrón de Supelco FAME de 37 componentes que puede ser aplicado para identificar los ésteres metílicos de ácidos grasos en una amplia variedad de alimentos. Este patrón contiene los ésteres metílicos de ácidos grasos que van desde el C4:0 hasta el C24:1, incluyendo la mayoría de los ésteres metílicos de los ácidos grasos más importantes saturados, monoinsaturados y poliinsaturados [66]. Utilizando el programa de temperatura optimizado anteriormente, se inyectó en el cromatógrafo 1 μ L del patrón FAME y el cromatograma resultante se muestra en la Figura 12.

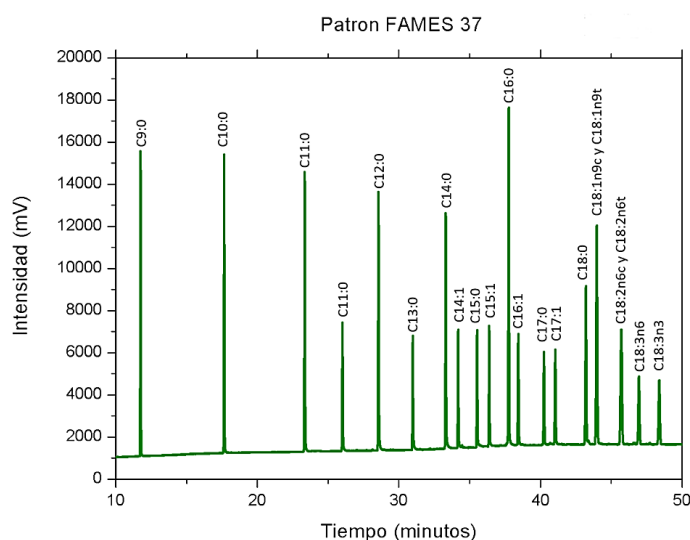


Figura 12. Cromatograma del patrón FAME. Cada pico está identificado con su compuesto correspondiente.

Al igual que en el caso de la muestra de nuez, en la Figura 12 se observa una buena separación cromatográfica de todos los picos.

Posteriormente, se procedió a realizar la identificación de los picos del cromatograma de la muestra de nuez por comparación con el cromatograma obtenido a partir del patrón FAME de Supelco. En este caso se adicionó un patrón interno cuando se realizó la derivatización del aceite extraído de la muestra. El patrón interno utilizado fue el ácido heptadecanoico o ácido margárico



que no forma parte de la composición de los alimentos y que permite comprobar las posibles variaciones en el área y en los tiempos de retención de los picos cromatográficos como consecuencia de la irreproducibilidad en la inyección de la muestra. La comparación entre los tiempos de retención a los que aparecían los picos en ambos cromatogramas y la superposición de ambos permitió identificar los 5 ácidos grasos presentes en la muestra de nuez: Palmítico, Estearico, Oleico, Linoleico y α -Linolénico, así como el patrón interno: margárico (Figura 13)

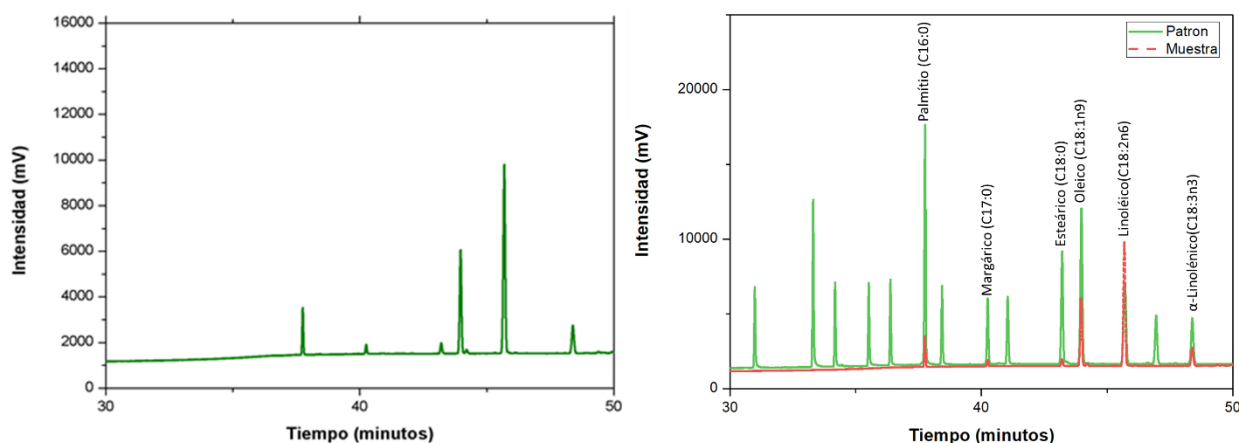


Figura 13. Cromatograma correspondiente al aceite extraído de la muestra #1 (Izquierda) y superposición de cromatogramas correspondientes al patrón y a la muestra (Derecha)

Como puede observarse, se pudo realizar de forma inequívoca la identificación de los 5 picos correspondiente a los ésteres de los ácidos grasos del aceite extraído de la muestra de nuez.

5.3. Análisis de las muestras de nueces

Una vez establecidas las condiciones de extracción, derivatización y de la medida instrumental, así como la identificación de los ésteres de los ácidos grasos, se llevó a cabo la determinación del porcentaje de los ésteres en 12 muestras de nueces, 1 muestra de aceite de nuez y 1 muestra de almendra.

Se realizó un amplio muestreo de nueces de la especie *Juglans Regia* que se encuentran en el mercado al alcance del consumidor. Así se obtuvieron muestras de diferentes orígenes, concretamente de Estados Unidos, Chile, Francia y España. Dentro del grupo de las muestras españolas encontramos nueces de Jerez de la Frontera, Cáceres, Albacete y Lleida. En total se analizaron 12 muestras de nueces y un aceite de nuez de origen francés cuyos datos aparecen recogidos en la Tabla 5 en el apartado de materiales y métodos. Además, y como contraste se



analizó una muestra de almendra de origen español que es un fruto seco característico de la dieta mediterránea y que se consume ampliamente en España.

En total se analizaron 14 muestras por triplicado siguiendo la metodología optimizada en este trabajo. Se calcularon los porcentajes medios de cada ácido graso a partir del porcentaje del éster correspondiente. Los resultados medios y los coeficientes de variación aparecen recogidos en la Tabla 5.

Tabla 5. Composición de ácidos grasos (% m/m) de los aceites extraídos de las muestras.

Muestras	% Ácido α - Linolénico C18:3n3 ω 3	CV %	% Ácido Linoleico C18:2n6 ω 6	CV %	% Ácido Oleico C18:1n9 ω 9	CV %	% Ácido Esteárico C18:0	CV %	% Ácido Palmítico C16:0	CV %
1	6,41	5,07	49,79	2,56	30,21	1,35	3,21	3,74	10,37	18,68
2	7,55	6,04	52,30	1,04	25,90	3,72	3,61	9,75	10,64	13,35
3	9,53	4,84	61,83	1,19	16,24	4,27	4,22	9,34	8,18	1,66
4	7,19	3,26	54,08	2,23	25,72	1,82	3,54	7,84	9,47	11,36
5	11,26	2,28	62,25	0,33	14,66	2,40	3,64	6,56	8,18	3,44
6	11,85	2,75	61,57	1,73	15,83	0,88	3,00	11,20	7,74	14,40
7	12,18	3,20	60,61	0,52	16,41	2,05	3,04	8,51	7,77	1,33
8	8,73	4,39	60,19	0,90	18,77	2,47	3,43	8,30	8,88	2,42
9	9,21	5,08	61,12	0,60	17,67	2,11	3,28	8,26	8,73	2,90
10	8,83	7,68	58,08	1,07	21,22	2,20	3,28	12,66	8,59	9,38
11	10,65	0,99	60,45	0,50	17,58	1,43	3,27	5,53	8,06	0,59
12	9,21	5,97	59,54	0,52	18,40	2,02	3,32	7,36	9,53	1,71
13	11,44	6,03	61,80	0,54	15,43	3,06	3,39	9,91	7,93	2,81
14	ND	-	16,60	0,90	73,43	0,27	2,61	4,76	7,36	1,03

*ND: No detectado para la muestra de almendra

5.4. Estudio descriptivo

En la Tabla 5 se puede observar que el ácido graso que se encuentra en mayor proporción es el ácido linoleico (ω 6). El orden en porcentaje de los ácidos grasos es: Linoleico (ω 6) > Oleico (ω 9) > α -Linolénico (ω 3) > palmítico > esteárico, estando este orden en concordancia con los publicados en la bibliografía para muestras de nueces [31,56,57,69].

Por simple inspección de los resultados, se observa que para el ω 3 el porcentaje más bajo lo presenta la muestra #1 que se trata de una nuez de Albacete de origen España, y el más alto lo presenta la muestra #7, una nuez de origen chileno. Para el ω 6, la variación es más amplia, siendo



la muestra #1 la que presenta el porcentaje más bajo y la muestra #5 de Lleida la que presenta el porcentaje más alto. En el caso del $\omega 9$, la muestra que presenta el porcentaje más bajo es la muestra #5, mientras que la muestra con mayor porcentaje es la muestra #1. Para el ácido esteárico, las muestras #6 y #7 de origen chileno poseen los porcentajes más bajos mientras que la muestra #3, cuyo origen es Cáceres, presenta el porcentaje más alto. Finalmente, para el caso del ácido palmítico, los porcentajes más altos los presentan las muestras #1 y #2 ambas de Albacete y los más bajos los presentan las muestras #6 y #7 de Chile. En cuanto a la muestra #13, aceite de nueces de origen Francés, observamos los valores para los ácidos $\omega 3$ y $\omega 6$ se encuentran entre los más altos. En el caso de la muestra #14 que corresponde a una muestra de almendra española, no se detecta el $\omega 3$ y el porcentaje de $\omega 6$ es 4 veces inferior al de las nueces analizadas [70]. No obstante, el porcentaje del $\omega 9$ es aproximadamente 4 veces superior comparado con las muestras de nueces. Los bajos porcentajes de los ácidos grasos poliinsaturados para la muestra #14 podrían ser los responsables de que la calidad del sabor de las almendras se mantenga durante más tiempo cuando se compara con las nueces. No obstante, la nuez en general presenta propiedades más saludables que la almendra. Este resultado está en concordancia con los que se obtienen al realizar análisis sensoriales de muestras de nueces y almendras de cosechas de diferente año.

Todos los anteriores porcentajes determinados para las muestras se encuentran dentro de los rangos publicados en la bibliografía para muestras de nueces (*Juglans Regia*) [15,31,56,57,59,60,65,69].

Para completar el estudio descriptivo se representaron los resultados que aparecen en la Tabla 5 en forma de diagrama de estrellas y rayos. El diagrama de estrellas y rayos consiste en una representación gráfica multivariante que permite visualizar el conjunto de resultados estandarizados y permite caracterizar y comparar las diferentes muestras en función a la forma de la estrella. La forma que adopta cada gráfica es única para cada muestra, ya que depende de los porcentajes de los ácidos grasos que la componen y del conjunto.

La estandarización da escala a la dimensión de cada polígono, para ello a cada resultado de cada ácido graso en una muestra se le resta la media de los resultados de todas las muestras para ese ácido graso y se divide por la desviación estándar de los porcentajes de los ácidos grasos. El cálculo se establece a partir de la siguiente ecuación:



$$L = \frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{s_j}$$

Donde L es la desviación del porcentaje del ácido graso respecto a la media, x_{ij} es el porcentaje de un ácido graso en una muestra, \bar{x}_j es el valor medio de los porcentajes de ácidos grasos de todas las muestras para un ácido graso y s_j es la desviación estándar de los porcentajes de los ácidos grasos de todas las muestras para un ácido graso.

En la Figura 14 se muestran los diagramas de estrellas y rayos para las nueces analizadas en este trabajo, donde cada uno de los ejes corresponde con los valores estandarizados de los cinco ácidos grasos presentes en las nueces tal y como aparece en la leyenda.

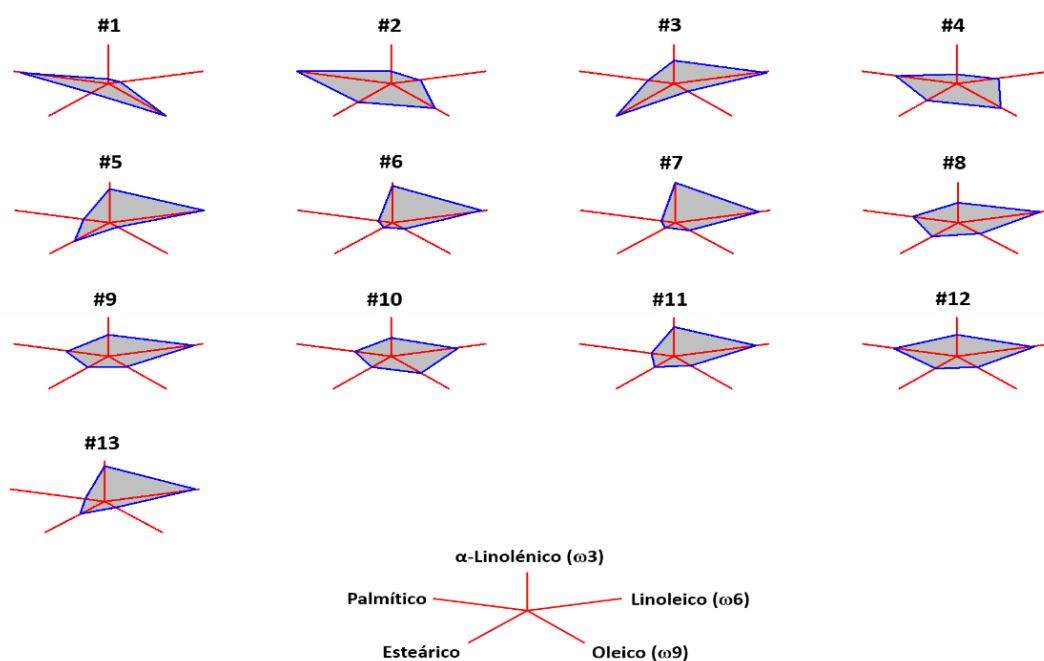


Figura 14. Gráfico de estrellas y rayos de muestras de nueces

Como se puede observar en la Figura 14, las muestras difieren en composición entre ellas ya que presentan formas distintas entre sí. Se aprecian similitudes entre las muestras #6 y #7 de origen chileno y entre las muestras #8 y #9 de Estados Unidos. La muestra #1 presenta porcentajes altos de ω_9 y palmítico, sin embargo, presenta los valores más bajos de porcentaje de ω_6 y ω_3 . En el caso de la muestra #3, esta presenta el porcentaje más alto en el ácido esteárico. La muestra #5 de origen Lleida presenta el porcentaje más alto de ω_6 y el porcentaje más bajo para el ω_9 . Las muestras #6 y #7 alcanzan los porcentajes más altos de ω_3 y más bajos en los ácidos grasos saturados. La muestra #10 de origen francés presenta valores intermedios para todos los ácidos grasos.



En numerosas publicaciones donde se analizan alimentos que contienen ácidos grasos se calculan la relación $\omega 6/\omega 3$, los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y los poliinsaturados debido al interés que estos parámetros tienen para la calidad de los alimentos y en consecuencia la salud del consumidor [56,57,69,71]. En la Tabla 6 se muestra la relación $\omega 6/\omega 3$, los ácidos grasos saturados (SFA) que representan la suma de los ácidos grasos saturados en el aceite extraído de las muestras y los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) que son la suma de los ácidos grasos poliinsaturados en el aceite de las nueces. Estos parámetros son de especial interés como se ha comentado en la introducción y aparecen en la información nutricional de algunos alimentos. En la tabla no aparecen los ácidos grasos monoinsaturados (*Monoinsaturated fatty acids*, MUFA) ya que el valor de este parámetro coincide con el porcentaje de ácidos grasos $\omega 9$ en el caso de las nueces.

Para las muestras de nueces analizadas la relación $\omega 6/\omega 3$ varía desde 5:1 para la muestra # 7 hasta 7,8:1 para la muestra # 1 que son relaciones próximas a la que debe aparecer en las membranas celulares. Este resultado indica que las nueces son un alimento saludable y recomendable ya que, en la ingesta diaria de alimentos de la dieta occidental la relación $\omega 6/\omega 3$ varía desde 15:1 a 20:1 que es demasiado alta [13].

Tabla 6. Composición total de ácidos grasos (%m/m) de los aceites extraídos de las muestras

<i>Muestras</i>	$\omega 6/\omega 3$	Ácidos grasos saturados (SFA)	Ácidos grasos poliinsaturados (PUFA)
1	7,8	13,58	56,21
2	6,9	14,25	59,85
3	6,5	12,40	71,36
4	7,5	13,01	61,27
5	5,5	11,82	73,52
6	5,2	10,74	73,43
7	5,0	10,81	72,79
8	6,9	12,31	68,92
9	6,6	12,01	70,32
10	6,6	11,87	66,91
11	5,7	11,32	71,09
12	6,5	12,86	68,74
13	5,4	11,32	73,25
14	-	9,97	16,60

SFA (*Saturated fatty acids*); PUFA (*Poly-unsaturated fatty acids*)



En relación al porcentaje de ácidos grasos saturados (SFA), se observa que la muestra #2 presenta el valor más alto, mientras que las muestras #6 y #7 presentan los valores más bajos. Estos porcentajes están muy por debajo de los presentes en otros alimentos como carne, pescado y huevo con valores entorno al 30% y la leche con porcentajes del orden del 60%. Una elevada ingesta diaria de SFA es un factor de riesgo para el desarrollo de la obesidad y enfermedades cardiovasculares, por lo tanto, la calidad de un aceite de nuez es inversa a su porcentaje de ácidos grasos saturados.

Las nueces también contienen ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), concretamente el $\omega 9$, que no es esencial dado que el organismo puede sintetizarlo y es beneficioso para la prevención de enfermedades cardiovasculares y la mejora de la diabetes de tipo 2 [23,24]. La muestra de almendra presenta un porcentaje de $\omega 9$ tres veces superior a las nueces.

En cuanto al porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (*Polyunsaturated fatty acids*, PUFA), son el principal grupo de ácidos grasos presentes en los aceites de nueces. Las muestras #5 (Lleida), #6 (Chile) y #13 (Aceite de nuez) presentan los valores más altos mientras que la muestra #1 (Albacete) presenta el valor más bajo. Los ácidos grasos poliinsaturados son esenciales y no pueden ser sintetizados por el organismo humano por lo que necesitamos un aporte exógeno que debe ser suplido por la dieta. Las nueces son una fuente rica de ácidos grasos poliinsaturados que previenen enfermedades cardiovasculares disminuyendo los niveles de colesterol [18].

5.5. Análisis de correlación y Análisis de la varianza (ANOVA)

Tras finalizar el estudio descriptivo de los resultados, se realizó un análisis de correlación entre los distintos ácidos grasos para las muestras de nueces, con un nivel de significación del 95%. El valor del coeficiente de correlación de Pearson varía desde -1 a +1 y mide la fuerza de la relación lineal entre las variables. El coeficiente de correlación obtenido entre el $\omega 6$ y el $\omega 3$ igual a 0,8168, indica que cuando el porcentaje de $\omega 6$ aumenta también lo hace el porcentaje de $\omega 3$. Por el contrario el coeficiente de correlación entre el $\omega 6$ y $\omega 9$ es de un -0,9748, lo que indica que existe una alta correlación lineal negativa entre ambas variables, es decir, cuando el porcentaje del $\omega 6$ aumenta el porcentaje del $\omega 9$ disminuye y viceversa. También se encontró que existía una correlación negativa entre el $\omega 3$ y el $\omega 9$, en este caso el coeficiente de correlación obtenido fue de -0,8775. En todos los casos el p-valor para estos coeficientes fue de 0,0000 lo que indica que las correlaciones son estadísticamente significativas. El resto de las correlaciones no eran estadísticamente significativas.



Con vistas a establecer diferencias entre las nueces muestreadas se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA). El análisis de la varianza determina diferencias estadísticamente significativas entre las medias aritméticas de una variable por comparación de varianzas. De esta forma, el análisis de la varianza descompone la variación total en distintas fuentes, pudiendo comparar la varianza debida a la variabilidad presente entre grupos con la varianza que es debida a la variabilidad de las réplicas. Para diferenciar una media aritmética de otra se utilizó el procedimiento de las mínimas diferencias significativas de Fischer con una probabilidad p-valor igual a 0,05 [72,73]. En el presente trabajo el ANOVA se utilizó para establecer las diferencias entre nueces de origen de España, Francia, EEUU y Chile haciendo uso de los porcentajes de ácidos grasos presentes en las muestras.

Tabla 7. Resultados del ANOVA

Ácido graso	Razón-F	p-valor
Palmítico	3,19	0,0368
Esteárico	5,54	0,0035
Oleico	3,96	0,0165
Linoleico	4,28	0,0120
α -Linolénico	10,81	0,0000

Como podemos observar en la Tabla 7 aparecen cinco p-valores inferiores a 0,05, por lo que existen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de diferente origen, con un nivel de confianza del 95%. El empleo del p-valor como único criterio estadístico para establecer diferencias ha sido cuestionado numerosas veces en la bibliografía debido a frecuentes errores de interpretación que llevan a clasificar los efectos en significativos o no significativos sin tener en cuenta la intensidad de los mismos [74]. Por esta razón, con el fin de complementar la discusión de los resultados se recurre al cociente F. Este parámetro es el valor experimental usado para el test-F que relaciona los cuadrados medios de cada factor con el cuadrado medio del error total, es decir, consiste en una comparativa entre varianzas utilizada para identificar la existencia de diferencias significativas entre ambas. Los efectos menos significativos presentarán un valor de F más bajo y los efectos con mayor influencia alcanzarán un mayor cociente F.

En las Figuras 15 y 16 se muestran los intervalos de confianza para cada ácido graso. Considerando cada ácido individualmente, las nueces de Chile presentan los porcentajes significativamente más altos del $\omega 3$, no existiendo diferencias significativas para el resto de las



nueces. Las nueces de origen chileno al contener los niveles más altos de $\omega 3$ serían recomendables en dietas que requieran una mejora de las funciones cardiovasculares. Con respecto al $\omega 6$, las nueces de origen español y francés presentan un menor contenido en $\omega 6$, siendo esta diferencia significativa cuando se comparan las nueces de origen español con las nueces de EEUU. En relación al $\omega 9$, las nueces españolas presentan el mayor porcentaje diferenciándose significativamente de las nueces de Chile

Gráfico de medias para los porcentajes del ácido alfa linolénico (Omega-3)

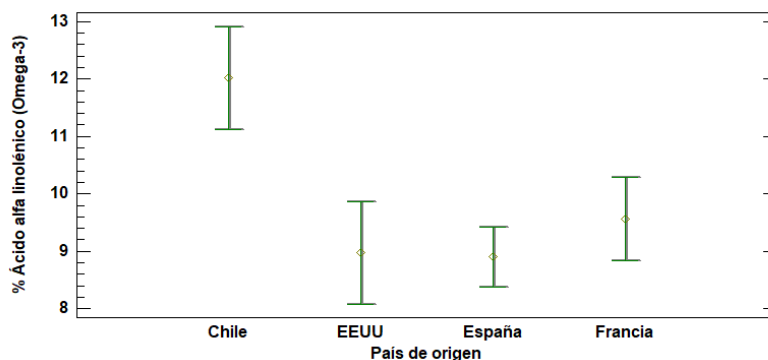


Gráfico de medias para los porcentajes del ácido linoleico (Omega-6)

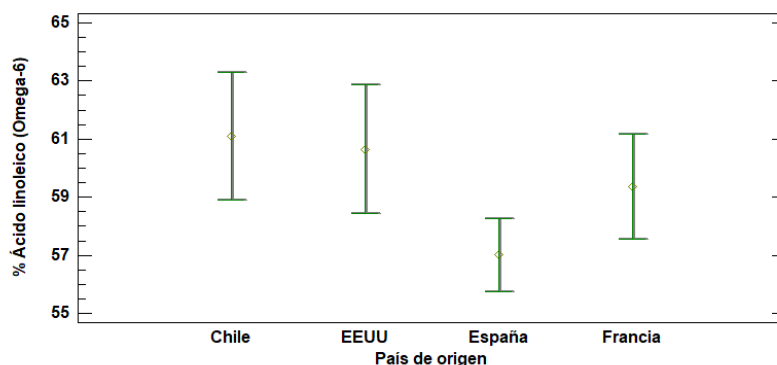


Gráfico de media para los porcentajes del ácido oleico (Omega-9)

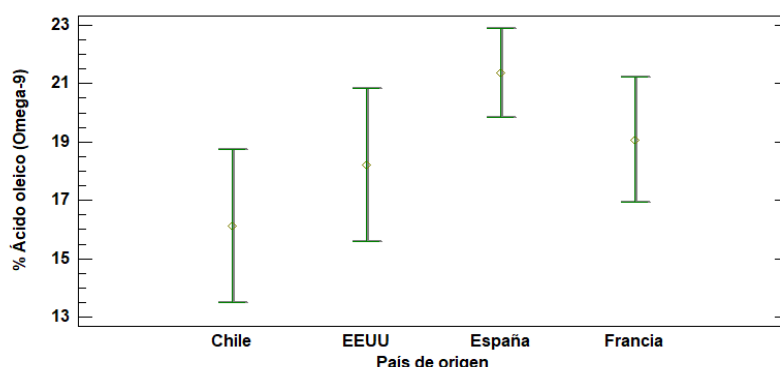


Figura 15. Intervalos de confianza para la media según el país de origen para los ácidos grasos insaturado



. Para los ácidos palmítico y esteárico, de nuevo existen diferencias significativas entre las nueces de España y de Chile, siendo las nueces chilenas las que presentan un menor porcentaje. En resumen, las nueces de Chile presentan un perfil de ácidos grasos muy saludable y recomendable para aquellas personas que requieran dietas bajas en ácidos grasos saturados y/o personas con problemas de arteriosclerosis y cardiovasculares.

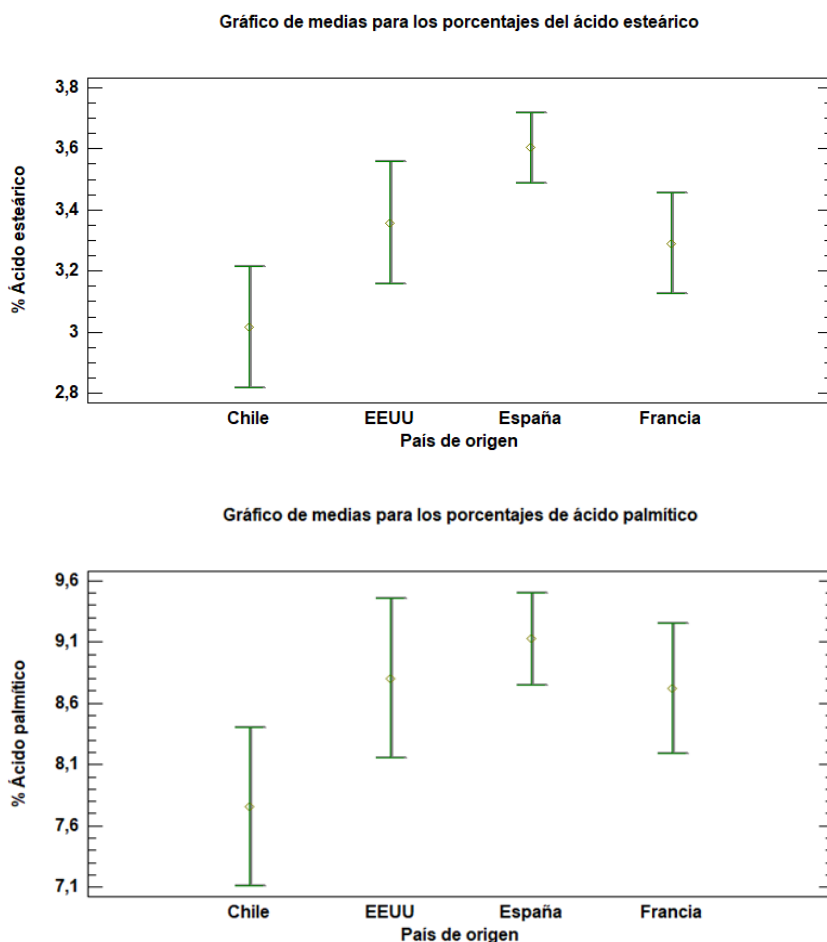


Figura 16. Intervalos de confianza para la media según el país de origen para los ácidos grasos saturados



6. CONCLUSIÓN

Se ha logrado de forma satisfactoria adaptar un método de extracción de aceite de nueces de macadamia (*Macadamia Integrifolia*) para la extracción de aceite de nueces (*Juglans Regia*) haciendo uso de la energía de ultrasonidos. Con esta metodología se ha conseguido acortar notablemente el tiempo de extracción de 12 horas a 30 minutos, así como minimizar el volumen del disolvente orgánico extractante nocivo para el operador y el medio ambiente.

Se estudiaron diferentes programas de temperatura para la separación cromatográfica y se seleccionó aquel que conllevó una mayor resolución de los picos con adecuada sensibilidad para la separación de los cinco ácidos grasos presentes en las nueces.

Los resultados de las muestras analizadas con distintos orígenes geográficos mostraron diferencias estadísticamente significativas para los cinco ácidos grasos. El mayor contenido en ácido α -linolénico ($\omega 3$) lo presentan las muestras de Chile que también contienen un menor porcentaje en ácidos grasos saturados, por lo que estas nueces son muy recomendables para el caso de problemas cardiovasculares y de obesidad.

El alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados de las nueces implica beneficios para la salud del consumidor, pero conlleva inconvenientes en cuanto a la comercialización ya que el sabor se deteriora de una cosecha a otra. Estos resultados contrastan con los bajos contenidos de ácidos grasos poliinsaturados de otros frutos secos.



7. PLAN DE DIFUSIÓN

Los resultados obtenidos en este Trabajo Fin de Máster (TFM) deben ser difundidos y transmitidos a la sociedad. En primer lugar, se debe mencionar que este trabajo ha sido financiado por el IMEYMAT (Instituto Universitario de Investigación en Microscopía Electrónica y Materiales) y el Departamento de Química Analítica.

La primera vía de difusión consiste en la presentación del TFM en congresos científicos de ámbito nacional o internacional. Con el objetivo de divulgar el conocimiento adquirido en esta investigación entre la comunidad científica se pretende presentar una comunicación en formato póster titulada: **“Determinación de ácidos grasos por cromatografía de gases para la diferenciación de nueces (*Juglans Regia*)”** en el XVII REUNIÓN DEL GRUPO REGIONAL ANDALUZ DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA ANALÍTICA (GRASEQA 2020).

Por otra parte, estos conocimientos también se pretenden transmitir a la comunidad científica mediante artículos de investigación en revistas internacionales de alto índice de impacto como Food Chemistry o Talanta.

Por último y como parte importante de los objetivos de difusión y divulgación de este proyecto, todos los avances del conocimiento se difundirán en redes tanto de ámbito científico como divulgativo (ResearchGate, Twitter...).



8. BIBLIOGRAFÍA

1. Valenzuela R, Tapia G, González M, Valenzuela A. Omega-3 fatty acids (EPA and DHA) and its application in diverse clinical situations. *Rev Chil Nutr.* 2011;38:356–67.
2. Aires D, Capdevilla N, Segundo MJ. Ácidos Grasos Esenciales y Sistema Inmune. *Fabibib.* 2005;8:269–81.
3. Maria IT, Sánchez-Morgado JR, García-Parra JR, Hernández TR, González-Gomez D. Comparative study of the nutritional and bioactive compounds content of four walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *J Food Compos Anal.* 2013;31(2):232–7.
4. Jaureghi-Berho AN. Desarrollo de nueces (*Juglans Regia*) de la variedad semilla California recubiertas con miel. Universidad de Chile. 2006.
5. Arranz S, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F. Antioxidant capacity of walnut (*Juglans regia* L.): Contribution of oil and defatted matter. *Eur Food Res Technol.* 2008;227(2):425–31.
6. Solá R, Masana L. Importancia de los frutos secos. Revisión y aportaciones españolas a su estudio. *Clin Invest Arterioscler.* 2000;12:27–30.
7. Regueiro J, Sánchez-gonzález C, Vallverdú-queralt A, Simal-gándara J, Lamuela-raventós R, Izquierdo-pulido M. Comprehensive identification of walnut polyphenols by liquid chromatography coupled to linear ion trap – Orbitrap mass spectrometry. *Food Chem.* 2014;152:340–8.
8. Fukuda T, Ito H, Yoshida T. Antioxidative polyphenols from walnuts (*Juglans regia* L .). 2003;63:795–801.
9. Eaton SB, Konner M. Paleolithic Nutrition: A Consideration of Its Nature and Current Implications. *N Engl J Med.* 1985;312(5):283–9.
10. Shahidi F. Omega-3 Fatty Acids in Health and Disease in growth and development. *Omega-3 Oils Appl Funct Foods.* 1991;54:438–63.
11. AP S. Genetic variation and evolutionary aspects of diet. In: Papas. Antioxidants in human health and disease. 1996;16:33–50.
12. A.P. S. New products from the agri-food industry: The return of n-3 fatty acids into the food supply. *Cent Genet Nutr Heal Washingt.* 1999;34:S297–301.



13. Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother.* 2002;56(8):365–79.
14. Batirel S, Yilmaz AM, Sahin A, Perakakis N, Kartal Ozer N, Mantzoros CS. Antitumor and antimetastatic effects of walnut oil in esophageal adenocarcinoma cells. *Clin Nutr.* 2018;37(6):2166–71.
15. Gao P, Liu R, Jin Q, Wang X. Comparative study of chemical compositions and antioxidant capacities of oils obtained from two species of walnut : *Juglans regia* and *Juglans sigillata*. *Food Chem.* 2019;279:279–87.
16. Chen J, Yu X, Geng Q, Li M. Combination of Span 20 and pH-assisted walnut oil extraction during aqueous extraction process. *LWT - Food Sci Technol.* 2018;91:477–83.
17. FAO. Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation. 2008.
18. Russo GL. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids : From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. 2009;77:937–46.
19. Chowdhury R, Steur M. Dietary Polyunsaturated Fatty Acids and Chronic Systemic Inflammation — A Potentially Intriguing Link. *Am J Epidemiol.* 2015;181(11):857–60.
20. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in wild plants, nuts and seeds. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2002;11(S6):S163–73.
21. Davis BC, Kris-Etherton PM. Achieving optimal essential fatty acid status in vegetarians: Current knowledge and practical implications. *Am J Clin Nutr.* 2003;78:640–6.
22. Delgado GE, Krämer BK, Lorkowski S, März W, von Schacky C, Kleber ME. Individual omega-9 monounsaturated fatty acids and mortality—The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *J Clin Lipidol.* 2017;11(1):126-135.e5.
23. Palomer X, Pizarro-delgado J, Barroso E, Vázquez-carrera M. Palmitic and Oleic Acid : The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends Endocrinol Metab.* 2018;29(3):178–90.
24. Granado-Casas M, Mauricio D. Oleic Acid in the Diet and What It Does : Implications for Diabetes and Its Complications. *Bioact Food as Diet Interv Diabetes.* 2nd ed. 2019;211–29.
25. Von Schacky C. Omega-3 fatty Acids in cardiovascular disease - An uphill battle.



Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids. 2015;92:41–7.

26. Nakamura H, Tsujiguchi H, Kambayashi Y, Hara A, Miyagi S, Yamada Y, et al. Relationship between saturated fatty acid intake and hypertension and oxidative stress. *Nutrition*. 2019;61:8–15.
27. Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M, Carnethon M, Daniels S, Franch HA, et al. Diet and lifestyle recommendations revision 2006: A scientific statement from the American heart association nutrition committee. *J Am Heart Assoc*. 2006;114(1):82–96.
28. Granados S, Quiles JL, Gil A, Ramírez-Tortosa MC. Lípidos de la dieta y cáncer. *Nutr Hosp*. 2006;21:44–54.
29. Capecchi S, Amato M, Sodano V, Verneau F. Understanding beliefs and concerns towards palm oil: Empirical evidence and policy implications. *Food Policy*. 2019;89:101785.
30. Gao P, Liu R, Jin Q, Wang X. Comparison of solvents for extraction of walnut oils : Lipid yield , lipid compositions , minor-component content , and antioxidant capacity. *LWT - Food Sci Technol*. 2019;110:346–52.
31. Dogan BM, Akgul A, Faculty E, Faculty A. Fatty acid composition of some walnut (*Juglans regia* L .) cultivars from east Anatolia. *Grasas y Aceites*. 2005;56:328–31.
32. Martínez ML. Extracción y caracterización de aceite de nuez (*Juglans Regia*):Influencia del cultivar y de sus factores tecnológicos sobre su composición y estabilidad oxidativa. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Exactas, Física y Nat. 2010.
33. Maguire LS, O’Sullivan SM, Galvin K, O’Connor TP, O’Brien NM. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. *Int J Food Sci Nutr*. 2004;55(3):171–8.
34. Planinic M, Bilic M, Velic D, Bucic A. Study of solid – liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. 2007;81:236–42.
35. M.D L de C, F P-C. Soxhlet extraction : Past and present panacea. *J Chromatogr A*. 2010;1217(16):2383–9.
36. Espada-Bellido E, Ferreiro-González M, Carrera C, Palma M, Barroso CG, Barbero GF. Optimization of the ultrasound-assisted extraction of anthocyanins and total phenolic



compounds in mulberry (*Morus nigra*) pulp. Food Chem. 2017;219:23–32.

37. Vázquez-Espinosa M, Espada-Bellido E, De Peredo AVG, Ferreiro-González M, Carrera C, Palma M, et al. Optimization of microwave-assisted extraction for the recovery of bioactive compounds from the chilean superfruit (*aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz). Agronomy. 2018;8(11):1–15.
38. Belandria V, Aparecida de Oliveira PM, Chartier A, Rabi JA, de Oliveira AL, Bostyn S. Pressurized-fluid extraction of cafestol and kahweol diterpenes from green coffee. Innov Food Sci Emerg Technol. 2016;37:145–52.
39. Villanueva-Bermejo D, Calvo M V., Castro-Gómez P, Fornari T, Fontecha J. Production of omega 3-rich oils from underutilized chia seeds. Comparison between supercritical fluid and pressurized liquid extraction methods. Food Res Int. 2019;115:400–7.
40. González de Peredo A V., Vázquez-Espinosa M, Espada-Bellido E, Jiménez-Cantizano A, Ferreiro-González M, Amores-Arocha A, et al. Development of new analytical microwave-assisted extraction methods for bioactive compounds from myrtle (*myrtus communis* L.). Molecules. 2018;23(11):2992.
41. González de Peredo A V., Vázquez-Espinosa M, Espada-Bellido E, Ferreiro-González M, Amores-Arocha A, Palma M, et al. Alternative Ultrasound-Assisted Method for the Extraction of the Bioactive Compounds Present in Myrtle (*Myrtus communis* L.). Molecules. 2019;24(5):882.
42. Mohammadpour H, Sadrameli SM, Eslami F, Asoodeh A. Optimization of ultrasound-assisted extraction of *Moringa peregrina* oil with response surface methodology and comparison with Soxhlet method. Ind Crop Prod. 2019;131:106–16.
43. Castejón N, Luna P, Señoráns FJ. Alternative oil extraction methods from *Echium plantagineum* L. seeds using advanced techniques and green solvents. Food Chem. 2018;244:75–82.
44. Stevanato N, Silva C da. Radish seed oil : Ultrasound-assisted extraction using ethanol as solvent and assessment of its potential for ester production. Ind Crop Prod. 2019;132:283–91.
45. Wang H, Suo Y, Wang X, Li Y, You J, Zhao X. Extraction of *Nitraria tangutorum* seed oil by



supercritical carbon dioxide and determination of free fatty acids by HPLC/APCI/MS with fluorescence detection. *Sep Purif Technol.* 2007;56(3):371–7.

46. Sala Vila A, Castellote-Bargalló AI, Rodríguez-Palmero-Seuma M, López-Sabater MC. High-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection for the determination of phospholipid classes in human milk, infant formulas and phospholipid sources of long-chain polyunsaturated fatty acids. *J Chromatogr A.* 2003;1008(1):73–80.
47. San José J, Sanz-Tejedor MA, Arroyo Y. Effect of fatty acid composition in vegetable oils on combustion processes in an emulsion burner. *Fuel Process Technol.* 2015;130(C):20–30.
48. Vongsivut J, Miller MR, McNaughton D, Heraud P, Barrow CJ. Rapid Discrimination and Determination of Polyunsaturated Fatty Acid Composition in Marine Oils by FTIR Spectroscopy and Multivariate Data Analysis. *Food Bioprocess Technol.* 2014;7(8):2410–22.
49. Lima T, Mattos L, Rocha P, Augusto M, Oliveira L De. A validated capillary electrophoresis method for fatty acid determination in encapsulated vegetable oils supplements. *LWT - Food Sci Technol.* 2019;114:108380.
50. Harold M M, James M M. Basic gas chromatography. Second editition. Vol. 1. 2009.
51. Química Analítica Instrumental II. Técnicas Cromatográficas. Universidad de México. 2007.
52. Braithwaite A, Smith FJ. Chromatographic methods. Kluwer Academic Publishers; 1999.
53. Parrales A, Reyes M, William V. Tesis doctoral. Cromatografía del gas natural. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad. 2012.
54. ORTEGA JJ, BLANCO M. La cromatografía de gases y su aplicación al análisis orgánico. 1985.
55. Gustavo M, Sequinel R, Eduardo J, Oliveira D. Ultra-fast gas chromatographic with flame ionization detector (UFGC-FID) and sonication methods for determination of total petroleum hydrocarbons fractions and BTEX in soil. *Microchem J.* 2019;150:104163.
56. Poggetti L, Ferfuia C, Chiabà C, Baldini M. Kernel oil content and oil composition in walnut (*Juglans regia* L.) accessions from north-eastern Italy. *J Sci Food Agric.* 2018;98(3):955–62.
57. Li L, Tsao R, Yang R, Kramer JKG, Hernandez M. Fatty acid profiles, tocopherol contents, and antioxidant activities of heartnut (*Juglans ailanthifolia* Var. *cordiformis*) and Persian



- walnut (*Juglans regia* L). *J Agric Food Chem*. 2007;55(4):1164–9.
58. Bada JC, León-Camacho M, Prieto M, Copovi P, Alonso L. Characterization of walnut oils (*Juglans regia* L.) from Asturias, Spain. *JAOCs, J Am Oil Chem Soc*. 2010;87(12):1469–74.
59. Viera-Alcaide I, Hamdi A, Jiménez-Araujo A, Rodríguez-Arcos R, Espejo-Calvo JA, Guillén-Bejarano R. Nutritional composition and antioxidant activity of different walnut varieties (*Juglans regia* L.) from Nerpio (Spain) in comparison to commercial varieties. *Grasas y Aceites*. 2019;70(3):1–8.
60. Rabadán A, Pardo JE, Pardo-Giménez A, Álvarez-Ortí M. Effect of genotype and crop year on the nutritional value of walnut virgin oil and defatted flour. *Sci Total Environ*. 2018;634:1092–9.
61. Zhu B, Lin L, Li J, Lv G, Huang M. Comparison of Four Different Extraction Methods of Oil from *Macadamia integrifolia*. 2013;613:3382–6.
62. Reglamento (CEE) nº 2568/91 de la comisión de 11 de julio de 1991 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. Vol. 32. 1991.
63. Özcan MM, Ghafoor K, Al Juhaimi F, Ahmed IAM, Babiker EE. Effect of cold-press and soxhlet extraction on fatty acids, tocopherols and sterol contents of the *Moringa* seed oils. *South African J Bot*. 2019;124:333–7.
64. Gu LB, Zhang GJ, Du L, Du J, Qi K, Zhu XL, et al. Comparative study on the extraction of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge (yellow horn) seed oil using subcritical n-butane, supercritical CO₂, and the Soxhlet method. *LWT-Food Sci Technol*. 2019;111:548–54.
65. Sena-moreno E, Pardo JE, Pardo-giménez A, Gómez R, Alvarez-ortí M, Pardo JE, et al. Differences in Oils from Nuts Extracted by Means of Two Pressure Systems. *Int J Food Prop*. 2016;19(12):2750–60.
66. Supelco. Comparison of 37 Component FAME Standard on Four Capillary GC Columns. Bulletin 907. 1996.
67. Niemi C, Lage S, Gentili FG. Comparisons of analysis of fatty acid methyl ester (FAME) of microalgae by chromatographic techniques. *Algal Res*. 2019;39:101449.



68. International Standard ISO 5509. Animal and vegetable fats and oils-Preparation of methyl esters of fatty acids. 2000.
69. Amaral JS, Casal S, Pereira JA, Seabra RM, Oliveira BPP. Determination of Sterol and Fatty Acid Compositions, Oxidative Stability, and Nutritional Value of Six Walnut (*Juglans regia* L.) Cultivars Grown in Portugal. *J Agric Food Chem*. 2003;51(26):7698–702.
70. Zhai MZ, Wang D, Wang ZY, Li L, Yang H. Fatty acid composition and tocopherol content of 13 Walnut cultivars grown in China. *Acta Hortic*. 2014;1050:291–8.
71. Gecgel U, Gumus T, Tasan M, Daglioglu O, Arici M. Determination of fatty acid composition of g-irradiated hazelnuts, walnuts, almonds, and pistachios. *Radiat Phys Chem*. 2011;80(4):578–81.
72. Thompson M, Mertens B, Kessler M, Fearn T. Efficacy of Robust Analysis of Variance for the Interpretation of Data From Collaborative Trials. 1993;118:235–40.
73. Beer J De, Federa SCC, Hoogmartens J, Samson I. Relationship Between Content Limits and Assay Methods : An Interlaboratory Statistical Evaluation. 1992;117:933–40.
74. Wasserstein RL, Lazar NA. The ASA Statement on p-Values: Context, Process, and Purpose. *Am Stat*. 2016; 70(2):129–33.